

⑬ BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENTAMT

⑫ **Offenlegungsschrift**
⑪ **DE 37 15984 A 1**

⑥ Int. Cl. 4:
G 01 N 33/535
G 01 N 33/577
// C 07 K 15/04, 15/06

⑳ Aktenzeichen: P 37 15 984.4
㉑ Anmeldetag: 13. 5. 87
㉒ Offenlegungstag: 19. 11. 87

Offener Eigentum

DE 37 15984 A 1

③① Unionspriorität: ③② ③③ ③①
13.05.86 JP P 109831/86

⑦① Anmelder:
Sanyo Chemical Industries, Ltd., Kyoto, JP

⑦④ Vertreter:
Deufel, P., Dipl.-Chem. Dipl.-Wirtsch.-Ing. Dr. rer. nat.;
Schön, A., Dipl.-Chem. Dr. rer. nat.; Hertel, W.,
Dipl.-Phys.; Lewald, D., Dipl.-Ing.; Otto, D., Dipl.-Ing.
Dr.-Ing., Pat.-Anw., 8000 München

⑦② Erfinder:
Tanaka, Yasuhiko; Sugiura, Masakazu; Sakata,
Kazuto, Kyoto, JP

⑤④ Enzym-Immunoassay

Es wird ein Enzym-Immunoassay zur Bestimmung eines Antigens mit verbesserter Empfindlichkeit bereitgestellt. Dieses Immunoassay weist folgende Reaktionsstufen auf

(1) Reaktion

(A) eines Immunkomplexes, der dadurch erhalten wurde, daß gleichzeitig eine antigene Substanz (a), ein immobilisierter erster Antikörper (b), der die antigene Substanz erkennt, und ein zweiter Antikörper (c), der die antigene Substanz erkennt und von einer anderen Tierart stammt, umgesetzt werden,

mit

(B) einem enzymmarkierten dritten Antikörper, der das Immunoglobulin erkennt, welches von der gleichen Tierart wie der zweite Antikörper stammt,

(2) Trennen der festen Phase von der flüssigen, und

(3) Bestimmung der Menge des in der festen Phase vorliegenden Enzyms mittels der Enzymaktivität.

DE 37 15984 A 1

Patentansprüche

1. Enzym-Immunoassay zur quantitativen Bestimmung einer antigenen Substanz, **gekennzeichnet durch folgende Reaktionsstufen:**

(1) Reaktion

(A) eines Immunkomplexes, der dadurch erhalten wurde, daß gleichzeitig eine antigenen Substanz (a), ein immobilisierter erster Antikörper (b), der die antigenen Substanz erkennt, und ein zweiter Antikörper (c), der die antigenen Substanz erkennt und von einer anderen Tierart stammt, umgesetzt werden, mit

(B) einem enzymmarkierten dritten Antikörper, der das Immunglobulin erkennt, welches von den gleichen Tierarten wie der zweite Antikörper stammt,

(2) Trennen der festen Phase von der flüssigen, und (3) Bestimmung der Menge des in der festen Phase vorliegenden Enzyms mittels der Enzymaktivität.

2. Enzym-Immunoassay nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß der dritte Antikörper von der gleichen Tierart wie der erste Antikörper stammt.

3. Enzym-Immunoassay nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß der erste Antikörper auf einem anorganischen oder organischen Träger immobilisiert ist.

4. Enzym-Immunoassay nach Anspruch 1, 2 oder 3, dadurch gekennzeichnet, daß der zweite Antikörper ein monoklonaler Antikörper ist.

Beschreibung

Die Erfindung betrifft ein Enzym-Immunoassay (EIA).

Als eine EIA-Technik ist die Sandwich-EIA-Methode bekannt. Diese Technik enthält die Reaktion eines an einen immobilisierten ersten Antikörper gebundenen Antigens mit einem enzymmarkierten zweiten Antikörper und die anschließende Bestimmung der Menge dieses Enzyms (US-PS 44 74 878).

Diese Technik hat jedoch den Nachteil, daß eine ausreichende Empfindlichkeit bei einem geringen Titer des zweiten Antikörpers nicht erzielt wird.

Der Erfindung liegt demnach die Aufgabe zugrunde, ein EIA mit einer verbesserten Empfindlichkeit bereitzustellen.

Eine andere Aufgabe dieser Erfindung ist die Bereitstellung eines EIA mit einer hohen Empfindlichkeit auch für den Fall, daß der Titer des zweiten Antikörpers gering ist. Weiterhin ist es Aufgabe der Erfindung, ein EIA zur Verfügung zu stellen, welches in der Lage ist, einen ungereinigten Antikörper als zweiten Antikörper mit einer ausreichend hohen Empfindlichkeit zu verwenden.

Schließlich ist es Aufgabe der Erfindung, ein EIA bereitzustellen, welches hochspezifisch die Bestimmung eines Antigens ermöglicht.

Diese Aufgabe wird durch das EIA gemäß Patentanspruch 1 gelöst. Diese und weitere Gegenstände der vorliegenden Erfindung, die nachfolgend noch verdeutlicht werden, wurden weitestgehend durch ein Enzymimmunoassay-Verfahren zur quantitativen Bestimmung antigenen Substanzen erreicht, es enthält folgende Verfahrensstufen:

1. Reaktion

(A) eines Immunkomplexes, erhalten durch gleichzeitige Umsetzung von (a) einer antigenen Substanz, (b) eines immobilisierten ersten Antikörpers, welcher die antigenen Substanz erkennt, und (c) eines zweiten Antikörpers, welcher die antigenen Substanz erkennt und von einer anderen Tierart stammt, mit (B) einem enzymmarkierten dritten Antikörper, welcher das Immunglobulin, das von den gleichen Tierarten wie der zweite Antikörper stammt, erkennt,

2. Trennung einer festen Phase von einer flüssigen, und

3. Bestimmung der Menge dieses in der festen Phase vorhandenen Enzyms mit Hilfe der Enzymaktivität.

Die Fig. 1, 2, 3, 4, 5 und 6 sind EIA-Standardkurven, jeweils erhalten aus Beispiel 1, Vergleichsbeispiel 1, Vergleichsbeispiel 2, Beispiel 2, Vergleichsbeispiel 3 und Vergleichsbeispiel 4.

Erläuternde Beispiele zu verwendender geeigneter antigenen Substanzen in der vorliegenden Erfindung sind

1) Hormone, wie Insulin, die Beta-Untereinheit des Human-Choriongonadotropin (HCG-Beta), Wachstumshormon, Thyrotropin (TSH), Thyroxin, Trijodthyronin und ähnliche,

2) Serumproteine, wie IgG, IgA, IgM, IgE, Alpha-Fetoprotein, Beta₂-Mikroglobulin, TBG und ähnliche,

3) tumorassoziierte Antigene wie Carcinoembryonische Antigen (CEA), Ferritin, POA, CA-19-9, CA125, und ähnliche, und

4) Krankheitserreger (pathogene Bakterien, Viren, Parasiten oder Protozoen, die verschiedene Krankheiten verursachen), wie Streptokokken, Hepatitisviren (wie Hepatitis-B Virus), Rubella-Virus, Herpes-Virus, Toxoplasma Gondii, Malaria Parasiten und ähnliche.

Unter diesen Antigenen werden HCG-Beta, TSH, CEA und Hepatitis-B-Virus unter Berücksichtigung ihrer

hohen Empfindlichkeit bevorzugt.

Geeignete erste Antikörper, die in dieser Erfindung anwendbar sind, sind polyklonale und monoklonale Antikörper. Polyklonale Antikörper können dadurch erhalten werden, daß ein Säugetier (wie Hase, Huhn, Schaf, Meerschweinchen und ähnliche) mit einem Antigen immunisiert werden. Zur Verwendung im erfindungsgemäßen Verfahren nützliche monoklonale Antikörper können durch bekannte Verfahren, wie in Nature 256, 495-497 beschrieben, beispielsweise erhalten werden. Grundsätzlich enthalten sie die Injektion eines Immunogens in eine Maus oder ein anderes geeignetes Tier, Fusion Antikörper produzierender Zellen des Tieres mit Myelomazellen (die von einer Maus oder einem anderen geeigneten Tier stammen), und Kultivieren oder über Aszites Stimulieren der sich ergebenden Hybridoma- oder Hybridzellen. Diese Antikörper können durch bekannte Verfahren gereinigt werden, wie Ammoniumsulfatfällung, DEAE-Cellulosechromatographie, Affinitätschromatographie und ähnliche.

Dieser erste Antikörper kann erfindungsgemäß auf einem anorganischen oder organischen Träger (unlösliches Festmaterial) immobilisiert werden.

Geeignete Träger sind anorganische Träger, beispielsweise kieselsäurehaltige Materialien (wie Glas (poröses Glas, mattiertes Glas und ähnliche), Siliziumdioxid (Silicagel, kolloidale Kieselsäure), Bentonit, Wollastonit, Cordierit und ähnliche) und nicht-kieselsäureartige Metalloxide (wie Aluminiumoxid, Spinell, Apatit, Hydroxypatit, Titanoxid, Zirkonoxid und magnetische Verbindungen (wie Eisenoxide, Ferrite, Nickeloxide, Kobaltoxide und ähnliche)), und organische Träger, beispielsweise Kunststoffe (wie Polystyrol und seine Derivate wie Poly(aminostyrol), Acrylpolymere, wie Polyacrylonitril, Polymethacrylate, wie Polymethylmethacrylat, Polyolefine, wie Polyethylen, Polypropylen, Polybutylen und Polybutadien, halogenenthaltende Polymere, wie Poly(vinylchlorid) und Poly(vinylidenchlorid), Polyester, wie Poly(ethylenenterephthalat), Polyamide, wie Nylon 6 und Nylon 6,6, und ähnliche), natürlich Polymere, wie Polysaccharide, Cellulose, Dextran, Agarose, Papier (z. B. Filterpapier), Polypeptide, Collagen und ähnliches.

Diese Träger können natürlich teilchenförmig sein und von einem fein zerteilten Pulver bis zu einem grobkörnigen Material variieren (beispielsweise etwa 20 bis etwa 100 mesh oder mehr, U.S. Standardsieb) oder können ein geformter Gegenstand wie ein Blatt oder Pellet oder dreidimensionale Gegenstände, wie Hohlkugeln, Teströhrchen, Schalen, Scheiben usw. sein. Von diesen werden Glas (insbesondere Glaskügelchen und Glas-teströhrchen) und Kunststoffe (Kunststoffröhrchen und Kunststoffschalen) bevorzugt. Diese Träger können porös oder durch bekannte Methoden, wie Ätzen oder Mattieren, chemische Behandlung, chemisches Überziehen und ähnliches oberflächenverändert sein.

Der Antikörper kann durch bekannte Mittel immobilisiert werden, welche von einfacher Adsorption bis zu chemischer Bindung variiert werden können. Chemische Kupplung beinhaltet typischerweise die Behandlung des Trägers mit einer oder mehreren chemischen Verbindungen (Silane, Polyisocyanate und ähnliche) gefolgt durch Kontaktieren des behandelten Trägers mit einer wäßrigen Lösung des Antikörpers. Die Adsorption erfolgt gewöhnlich derart, daß man eine wäßrige Lösung des Antikörpers, der immobilisiert werden soll, ausreichend lange mit einem Träger in Berührung bringt, so daß der gewünschte maximale Grad der Immobilisierung erzielt wird. Geeignete Beispiele und Verfahren zur Immobilisierung eines Antikörpers sind solche, bei denen eine physikalische Adsorption oder chemische Bindung an Glas mit einem Silankupplungsmittel und mit oder ohne ein Vernetzungsmittel, erfolgt, wie in der US-PS 42 80 992 beschrieben, und solche, durch physikalische Adsorption an Kunststoffe, wie in E. Engvall, J. Johnson, P. Parلمان, Biochim. Biophys. Acta, 251 (1971) 427-434 beschrieben.

Beispiele geeigneter zweiter Antikörper sind:

- 1) polyklonale Antikörper, die das Antigen erkennen und von einer Tierart stammen, die von der des ersten Antikörpers verschieden ist (beispielsweise Antikörper, die vom Huhn, Schaf, Meerschweinchen und ähnlichen stammen (wenn der erste Antikörper vom Kaninchen stammt), und Antikörper vom Kaninchen, Huhn, Meerschweinchen und ähnlichen (wenn der erste Antikörper vom Schaf stammt)), und
- 2) monoklonale Antikörper, hergestellt durch Kultivieren oder über Aszites Stimulieren der sich ergebenden Hybridoma oder Hybridzellen, die durch Fusion von Zellen erhalten werden, die gegen das Antigen Antikörper produzieren, (beispielsweise von einer Maus) mit Myelomazellen (von einer Maus), in dem Falle, wo der erste Antikörper ein polyclonaler Antikörper ist, der das Antigen erkennt und von einem Tier stammt (welches ein anderes als eine Maus ist).

Geeignete Formen eines zweiten Antikörpers sind beispielsweise Antisera, Hybridomakulturflüssigkeiten und Ascitesflüssigkeit ebenso wie durch Reinigung erhaltene Immunoglobuline.

Die Konzentration des Immunoglobulins, die im zweiten Bereich gemäß der Konzentration des Antigens in der zu prüfenden Probe und der Konzentration des enzymmarkierten dritten Antikörpers schwanken kann, beträgt im allgemeinen von etwa 0,1 bis etwa 1000 µg/ml, vorzugsweise von etwa 1 bis etwa 200 µg/ml.

Diese Immunkomplexe können erfindungsgemäß durch Reaktion des immobilisierten ersten Antikörpers, der antigenen Substanz und dem dritten Antikörper zur gleichen Zeit erhalten werden. Es werden beispielsweise ein erster, an einen unlöslichen Träger gebundenen Antikörper, eine Antigen enthaltene Probe, die zu testen ist, und eine einen zweiten Antikörper enthaltende Pufferlösung gleichzeitig zur Bildung eines Immunkomplexes inkubiert. Die Inkubation wird unter herkömmlichen Bedingungen, beispielsweise 5 bis 50°C, vorzugsweise 34 bis 40°C 5 Minuten bis 2 Tage lang, vorzugsweise 5 bis 30 Minuten lang, durchgeführt.

Nach der Inkubation können die nicht umgesetzten Stoffe aus dem erhaltenen Immunkomplex in üblicher Weise ausgewaschen werden. Es werden beispielsweise 1 bis 5 ml einer Waschflüssigkeit (wie destilliertes Wasser, physiologische Kochsalzlösung, Phosphatpuffer oder ähnliche) zu der inkubierten Mischung hinzugegeben und die Flüssigkeit durch Absaugen mit einer Wasserstrahlpumpe entfernt. Dieser Vorgang wird mehrere

Male wiederholt (beispielsweise zwei- bis fünfmal), um einen von nicht umgesetzten Stoffen getrennten Immunkomplex zu erhalten.

Beispiele dritter geeigneter Antikörper sind solche Antikörper, die Immunglobuline, die aus den gleichen Tierarten wie der zweite Antikörper stammen, erkennen: Beispielsweise Anti-Kaninchenimmunoglobulin-Antikörper (Meerschweinchen) in dem Fall, wo der zweite Antikörper vom Kaninchen stammt, Anti-Huhnimmunoglobulin-Antikörper (Maus) in dem Fall, wo der zweite Antikörper vom Huhn stammt, und Anti-Mausimmunoglobulin-Antikörper (Kaninchen) in dem Fall, wo der zweite Antikörper von der Maus stammt.

Hinsichtlich der Kombinationen der ersten, zweiten und dritten Antikörper wird bevorzugt, wegen einer geringeren unspezifischen Bindung, einen dritten Antikörper zu verwenden, der von der gleichen Tierart wie der erste Antikörper stammt. Erläuternde Beispiele der Kombinationen der ersten, zweiten und dritten Antikörper sind:

- (1) der erste Antikörper vom Kaninchen, der zweiten monoclonale Antikörper von der Maus und der dritte Antikörper vom Kaninchen,
- (2) der ersten Antikörper vom Meerschweinchen, der zweite Antikörper vom Schaf und der dritte Antikörper vom Meerschweinchen,
- (3) der ersten Antikörper vom Schaf, der zweite Antikörper vom Kaninchen und der dritte Antikörper vom Schaf, und
- (4) der erste Antikörper vom Huhn, der zweite monoclonale Antikörper von der Maus und der dritte Antikörper vom Huhn.

Unter diesen werden die Beispiele (1) und (4) wegen ihrer höheren Spezifität gegen das Antigen bevorzugt.

Geeignete Enzyme zur Markierung des dritten Antikörpers sind Peroxidase, alkalische Phosphatase, Beta-Galactosidase und ähnliche. Unter diesen wird die Peroxidase, die eine leichte Markierbarkeit des Antikörpers und eine hohe Empfindlichkeit aufweist, am meisten bevorzugt.

Die Markierung des dritten Antikörpers kann durch bekannte Methoden, beispielsweise solcher, wie in S. Yoshitake, M. Imagawa, E. Ishikawa, et al, J. Biochem. 92 (1982) 1413—1424 beschrieben, durchgeführt werden.

Die Reaktion des enzymmarkierten Antikörpers mit dem Immunkomplex, der durch gleichzeitige erfindungsgemäße Reaktion erhalten wurde, kann in herkömmlicher Weise durchgeführt werden. So wird z. B. der Immunkomplex in 100 bis 1000 μ l einer den enzymmarkierten Antikörper enthaltenden Lösung hinzugegeben, dann erfolgt eine Inkubation dieser Mischung. Die Inkubation kann unter gewöhnlichen Bedingungen durchgeführt werden; beispielsweise bei 5 bis 50°C, vorzugsweise 34 bis 40°C 5 Minuten bis 2 Tage, vorzugsweise 5 bis 30 Minuten lang.

Das Reaktionsprodukt aus dem Immunkomplex und dem enzymmarkierten Antikörper kann mit einer Waschlösung (wie destilliertes Wasser, physiologische Salzlösung, Phosphatpuffer und ähnlichen) gewaschen werden. Nach dem Waschen wird das Produkt in 100 bis 1000 μ l eines Substrates (wie 5-Amino-salicylsäure, o-Phenyldiamin, 2,2'-Azinodi(3-ethylbenzthiazolin)-6'-sulfonsäure (ABTS) oder ähnliche, vorzugsweise o-Phenyldiamin), eingebracht und anschließend inkubiert. Die Inkubation kann unter üblichen Bedingungen, beispielsweise 5 bis 50°C, vorzugsweise 30 bis 40°C 5 Minuten bis 1 Stunde lang, vorzugsweise 5 bis 30 Minuten lang ausgeführt werden. Nach der Inkubation wird die Reaktion durch Hinzugabe von 1 bis 10 ml einer Lösung wie Schwefelsäure, Chlorwasserstoffsäure oder ähnlichem zu der Inkubationsmischung beendet. Das so erhaltene Produkt wird zur Bestimmung der Enzymaktivität verwendet.

Die folgenden Beispiele erläutern die Erfindung.

Beispiel 1 (Bestimmung von CEA)

a) Herstellung der Human-CEA-Standardlösung

Die Konzentration einer hoch konzentrierten CEA-Lösung, erhalten von einem metastasierendem Darmtumor durch Perchlorsäureextraktion, wurde unter Verwendung des CEA International Reference Standard (63/701) der WHO und eines CEA-Bestimmungskits (CEA-EIA, hergestellt durch DAINABOT) bestimmt. Die Lösung wurde mit einem 0,02 M Phosphatpuffer derart verdünnt, daß jeweils Standardlösungen mit 5, 10, 30 und 60 ng/ml erhalten wurden.

b) Herstellung des Anti-CEA-monoclonalen Antikörpers

Eine Maus(Balb/c) wurde durch Injektion einer hochkonzentrierten Human-CEA-Lösung immunisiert. Nach 6 Wochen wurde aus der Milz eine Zellsuspension hergestellt und anschließend etwa 1×10^8 Milzzellen und etwa 2×10^7 Mausmyelomazellen unter PEG-Behandlung fusioniert. Die erhaltenen fusionierten Zellen wurden in einem HAT-Medium kultiviert, und anschließend einem Screening unterworfen, um die Antikörper produzierenden Zellen (Hybridoma) zu selektieren. Danach werden die Hybridomazellen durch Klonieren als Monoklon angezüchtet und anschließend werden die Monoklone über Aszites einer Maus stimuliert. Die erhaltene Aszitesflüssigkeit wird gereinigt, um ein monoklonales CEA-Immunglobulin zu gewinnen.

c) Herstellung des peroxidasemarkierten Anti-Maus-Immunglobulinantikörpers

Ein Anti-Mausimmunoglobulin-Antikörper (hergestellt durch Dako) wurde mit Peroxidase gemäß der im J. Biochem. 92 (1982), 1413—1424 beschriebenen Methode kombiniert und nachfolgend wird die erhaltene Lösung

1/10—1/5000 mit einem 1% Rinderserumalbumin enthaltenden Puffer verdünnt.

d) Herstellung der mit Anti-CEA-polyclonalen Antikörpern überzogenen Glaskügelchen

Anti-CEA polyclonale Kaninchenantikörper (hergestellt von Dako) wurden auf der Oberfläche von Glashohlkugeln nach dem Verfahren der US-PS 36 52 761 aufgezogen.

e) Quantitative Bestimmung des Human-CEA

Ein Glashohlkugeln, überzogen mit Kaninchen-anti-CEA-polyclonalen Antikörpern, und 50 µg einer 60 ng/ml Human CEA-Standardlösung wurden 15 Minuten lang bei 37°C in 300 µl einer 0,02 M Phosphatpuffer, enthaltend 10 bis 100 µg/ml des anti-CEA monoclonalen Antikörpers in einem Teströhrchen inkubiert. Danach erfolgt das Waschen des Hohlkugels mit destilliertem Wasser. Das Hohlkugeln wird in 300 µl einer peroxidasemarkierten Anti-Mausimmunoglobulin-Antikörperlösung gegeben und anschließend 15 Minuten lang bei 37°C inkubiert. Nach dem Waschen des Hohlkugels mit destilliertem Wasser, wird dieses 15 Minuten lang bei 37°C in 400 µl einer Substratlösung (p-Phenyldiaminlösung, die Wasserstoffperoxid enthält) inkubiert. Anschließend wird die Reaktion durch Hinzufügen von 3 ml einer 1,5 N Schwefelsäure beendet. Die Absorption der erhaltenen Lösung wird bei 492 nm zur Bestimmung der Enzymaktivität des am Hohlkugeln gebundenen Enzyms gemessen.

Die Enzymaktivitäten im Falle der Human-CEA Standardlösungen von 30, 10,5 und 0 ng/ml wurden jeweils in der gleichen Weise bestimmt, um eine Standardkurve zur Bestimmung des Human CEA, wie in Fig. 1 gezeigt, aufzustellen.

Die Ergebnisse der Bestimmung des Human-CEA werden in Tabelle 1 gezeigt.

Vergleichsbeispiel 1 (Bestimmung des CEA durch die Sandwich-Methode)

a) Herstellung der Human-CEA-Standardlösung

Beispiel 1, a) wurde wiederholt.

b) Herstellung des anti-CEA monoclonalen Immunoglobulins

Beispiel 1, b) wurde wiederholt.

c) Herstellung des peroxidasemarkierten anti-CEA monoclonalen Immunoglobulins

Das oben erwähnte anti-CEA monoclonale Immunoglobulin wurde mit Peroxidase in der gleichen Weise gekoppelt, wie in Beispiel 1, c) beschrieben. Nachfolgend wird die erhaltene Lösung 1/10—1/5000 mit einem 1% Rinderserumalbumin enthaltenden Puffer verdünnt.

d) Herstellung der mit anti-CEA polyclonalen Antikörpern überzogenen Glashohlkugeln

Beispiel 1, d) wurde wiederholt.

e) Quantitative Bestimmung des Human-CEA

Ein mit anti-CEA polyclonalen Kaninchenantikörpern überzogenes Glashohlkugeln und 50 µl einer 60 ng/ml Human-CEA Standardlösung wurden 15 Minuten lang bei 37°C mit 200 µl eines 0,02 M Phosphatpuffers in einem Teströhrchen inkubiert, anschließend wird das Hohlkugeln mit destilliertem Wasser gewaschen. Das Hohlkugeln wurde in 300 µl der Peroxidase markierten anti-CEA monoclonal Immunoglobulinlösung eingebracht und anschließend 15 Minuten lang bei 37°C inkubiert. Nach weiterem Waschen des Hohlkugels mit destilliertem Wasser wurde dieses 15 Minuten lang bei 37°C in 400 µl einer Substratlösung (o-Phenyldiaminlösung, die Wasserstoffsuperoxid enthält) inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion durch Hinzufügen von 3 ml einer 1,5 N Schwefelsäure beendet. Die Absorption der erhaltenen Lösung wurde zur Bestimmung der Enzymaktivität des an das Hohlkugeln gebundenen Enzyms bei 492 nm gemessen.

Die Enzymaktivitäten im Falle der Human-CEA Standardlösungen von jeweils 30, 10, 5 und 0 ng/ml wurden in der gleichen Weise gemessen, um eine Standardkurve zur Bestimmung des human CEA, wie in Fig. 2 gezeigt, zu erstellen.

Die Ergebnisse der Human-CEA Bestimmung werden in Tabelle 1 gezeigt.

Vergleichsbeispiel 2 (Bestimmung der CEA durch ein Verfahren aufeinanderfolgender Reaktionen)

a) Herstellung der Human-CEA-Standardlösung

Beispiel 1, a) wurde wiederholt.

b) Herstellung des Anti-CEA monoclonal Immunoglobulins

Beispiel 1, b) wurde wiederholt.

5 c) Herstellung des peroxidase markierten anti-CEA monoclonal Immunoglobulins

Beispiel 1, c) wurde wiederholt.

10 d) Herstellung der mit anti-CEA polyclonalen Antikörpern überzogenen Glashohlkugeln

Beispiel 1, d) wurde wiederholt.

e) Quantitative Bestimmung des Human-CEA

15 Ein mit Kaninchen anti-CEA polyclonalen Antikörpern überzogenes Glashohlkugeln und 50 µl einer 60 ng/ml Human-CEA Standardlösung wurden 15 Minuten lang bei 37°C mit 300 µl eines 0,02 M Phosphatpuffers in einem Teströhrchen inkubiert und anschließend wurde das Hohlkugeln mit destilliertem Wasser gewaschen. Das Hohlkugeln wurde dann in 300 µl 0,02 M Phosphatpuffer, enthaltend 10 bis 100 µg/ml des anti-CEA monoclonalen Antikörpers, eingebracht und anschließend 15 Minuten lang bei 37°C inkubiert. Nach
20 dem Waschen des Hohlkugeln mit destilliertem Wasser wurde dieses in 300 µl der peroxidase markierten anti-CEA monoclonal Immunoglobulinlösung eingebracht und anschließend 15 Minuten lang bei 37°C inkubiert. Nach weiterem Waschen des Hohlkugeln mit destilliertem Wasser wurde dieses in 400 µl einer Substratlösung (o-Phenylendiaminlösung, die Wasserstoffsuperoxid enthält) inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion durch Hinzufügen von 3 ml 1,5 N Schwefelsäure beendet. Die Absorption der erhaltenen Lösung zur Bestimmung der Enzymaktivität des an das Hohlkugeln gebundenen Enzyms wurde bei 492 nm gemessen.

25 Die Enzymaktivitäten im Falle der Human-CEA Standardlösungen mit jeweils 30, 10, 5 und 0 ng/ml wurden in der gleichen Weise gemessen, um eine Standardkurve zur Bestimmung des Human-CEA, wie in Fig. 3 gezeigt, zu erstellen. Die Ergebnisse der Bestimmung des Human-CEA werden in Tabelle 1 gezeigt.

30

Tabelle 1

35		Empfindlichkeit ng/ml	Testbereich ng/ml	Präzision ng/ml (Variationskoeffizient, %)	ng/ml (Variationskoeffizient, %)
	Beispiel 1	1,0	0—60	5,0 ± 0,4 (8,0%)	38,2 ± 2,2 (5,8%)
40	Vergleichsbeispiel 1	4,5	0—60	5,3 ± 0,9 (17,0%)	37,5 ± 5,3 (14,1%)
	Vergleichsbeispiel 2	3,9	0—60	6,6 ± 0,9 (13,6%)	40,2 ± 5,8 (14,4%)

45

Beispiel 2 (TSH-Bestimmung)

a) Herstellung der Human TSH Standardlösung

50 Human TSH (50 µg/Gefäß), erhalten von UCB Bioproducts, wurde mit 0,02 M Phosphatpuffer verdünnt, um Standardlösungen mit jeweils 50, 25, 2,5 und 0 IU/ml zu erhalten.

b) Herstellung des Anti-TSH monoclonalen Antikörpers

55 Beispiel 1, b) wurde wiederholt, mit der Ausnahme, daß anstelle des Human-CEA ein Human-TSH verwendet wurde, um einen anti-TSH monoclonalen Antikörper zu erhalten.

c) Herstellung der mit anti-TSH polyclonalen Antikörpern überzogenen Glashohlkugeln

60 Beispiel 1, d) wurde wiederholt, mit der Ausnahme, daß Anti-TSH polyclonale Kaninchenantikörper (hergestellt von Dako) anstelle der anti-CEA polyclonalen Kaninchenantikörper verwendet wurden.

d) Quantitative Bestimmung des Human-TSH

65 Ein mit anti-TSH polyclonalen Kaninchenantikörpern überzogenes Glashohlkugeln und 100 µl einer 50 IU/ml Human-TSH Standardlösung werden 30 bis 60 Minuten lang bei 37°C mit 200 µl eines 0,02 M Phosphatpuffers, der 10 bis 100 µg/ml anti-TSH monoclonalen Antikörpers enthält, in einem Teströhrchen inkubiert. Anschließend wird das Hohlkugeln mit destilliertem Wasser gewaschen. Dann wird das Hohlkugeln

chen in 300 µl einer Lösung eines peroxidasemarkierten anti-Mausimmunoglobulin-Antikörpers, hergestellt gemäß Beispiel 1c), eingebracht und 30 bis 60 Minuten lang bei 37°C inkubiert. Nach einem weiteren Waschen des Hohlkugelchens mit destilliertem Wasser wurde dieses 30 Minuten lang bei 10 bis 30°C in 400 µl einer Substratlösung (o-Phenylendiaminlösung, die Wasserstoffsuperoxid enthält) inkubiert. Danach wurde die Reaktion durch Hinzufügen von 3 ml 1,5 N Schwefelsäure beendet. Die Absorption der erhaltenen Lösung wurde zur Bestimmung der Enzymaktivität des an das Hohlkugelchen gebundenen Enzyms bei 492 nm gemessen. 5

Die Enzymaktivitäten im Falle der Human-TSH Standardlösungen mit jeweils 25, 5, 2,5 und 0 IU/ml wurden in der gleichen Weise gemessen, um eine Standardkurve zur Bestimmung des Human-TSH, gezeigt in Fig. 4, erstellt.

Die Ergebnisse der Human-TSH Bestimmung werden in Tabelle 2 gezeigt. 10

Vergleichsbeispiel 3 (Bestimmung des TSH durch die Sandwich-Methode)

a) Herstellung der Human-TSH Standardlösung

Beispiel 1, a) wurde wiederholt. 15

b) Herstellung des Anti-TSH monoclonal Immunoglobulin

Beispiel 2, b) wurde wiederholt. 20

c) Herstellung des peroxidasemarkierten anti-TSH monoclonal Immunoglobulin

Das oben erwähnte anti-TSH monoclonal Immunoglobulin wurde mit Peroxidase in der gleichen Weise, wie in Beispiel 1c) beschrieben, gekoppelt und die erhaltene Lösung 1/10— 1/5000 mit einem 1% Rinderserumalbumin enthaltenden Puffer verdünnt. 25

d) Herstellung der mit anti-TSH polyclonalen Antikörpern überzogenen Glashohlkugelchen

Beispiel 2c) wurde wiederholt. 30

e) Quantitative Bestimmung des Human-TSH

Ein mit anti-TSH polyclonalen Antikörpern überzogenes Glashohlkugelchen und 100 µl einer 50 IU/ml human TSH enthaltenden Standardlösung wurden 60 Minuten lang bei 37°C mit 200 µl eines 0,02 M Phosphatpuffers, der 10 bis 100 µg anti-TSH polyclonale Antikörper enthält, in einem Teströhrchen inkubiert und anschließend das Hohlkugelchen mit destilliertem Wasser gewaschen. Danach wurde das Hohlkugelchen in 300 µl einer Lösung aus peroxidasemarkierten anti-TSH monoclonal Immunoglobulin eingebracht und anschließend 60 Minuten lang bei 37°C inkubiert. Nachdem das Hohlkugelchen ein weiteres Mal mit destilliertem Wasser gewaschen wurde, wird dieses 30 Minuten lang bei 37°C in 400 µl einer Substratlösung (o-Phenylendiaminlösung, die Wasserstoffsuperoxid enthält) inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion durch Hinzufügen von 3 ml 1,5 N Schwefelsäure beendet. Die Absorption der erhaltenen Lösung wurde zur Bestimmung der Enzymaktivität des an das Hohlkugelchen gebundenen Enzyms bei 492 nm gemessen. 35 40

Die Enzymaktivitäten im Falle der Human-TSH Standardlösungen von jeweils 25, 5, 2,5 und 0 IU/ml wurden in der gleichen Weise gemessen, um eine Standardkurve zur Bestimmung des Human-TSH, dargestellt in Fig. 5, zu erstellen. 45

Die Ergebnisse der Human-TSH-Bestimmung werden in Tabelle 2 gezeigt.

Vergleichsbeispiel 4 (Bestimmung des TSH durch ein Verfahren aufeinanderfolgender Reaktionen)

a) Herstellung der Human-TSH Standardlösung

Beispiel 2, a) wurde wiederholt. 50

b) Herstellung des Anti-TSH monoclonal Immunoglobulins

Beispiel 2, b) wurde wiederholt. 55

c) Herstellung der mit anti-TSH polyclonalen Antikörpern überzogenen Glashohlkugelchen

Beispiel 2, c) wurde wiederholt. 60

d) Quantitative Bestimmung des Human-CEA

Ein mit Kaninchen anti-TSH polyclonalen Antikörpern überzogenes Glashohlkugelchen und 100 µl einer 50 IU/ml enthaltenden human TSH Standardlösung wurde 30 Minuten lang bei 37°C mit 0,02 M Phosphatpuffer in einem Teströhrchen inkubiert und anschließend das Hohlkugelchen mit destilliertem Wasser gewaschen. 65

Dann wurde das Hohlkugelchen in 300 µl eines 0,02 M Phosphatpuffers, der 10 bis 100 µg/ml des anti-TSH monoclonalen Antikörpers enthält, eingebracht und anschließend 30 Minuten lang bei 37°C inkubiert. Nach Waschen des Hohlkugelchens mit destilliertem Wasser wurde dieses in 300 µl einer Lösung aus einem peroxida-

5 semarkierten anti-Mausimmunoglobulin Antikörper gegeben und anschließend 30 Minuten lang bei 37°C inkubiert. Nach weiterem Waschen mit destilliertem Wasser wurde das Hohlkugelchen in 400 µl einer Substratlösung (o-Phenylendiaminlösung, die Wasserstoffsuperoxid enthält) inkubiert. Anschließend wird die Reaktion durch Hinzufügen von 3 ml 1,5 N Schwefelsäure beendet. Die Absorption der erhaltenen Lösung wird zur

Bestimmung der Enzymaktivität des an das Hohlkugelchen gebundenen Enzyms bei 492 nm gemessen.

10 Die Enzymaktivitäten im Falle der Human-TSH Standardlösungen von jeweils 25, 5, 2,5 und 0 IU/ml wurden in der gleichen Weise gemessen, um eine Standardkurve zur Bestimmung von Human-TSH, dargestellt in Fig. 6, zu erstellen.

Die Ergebnisse der Bestimmung des Human-TSH werden in Tabelle 2 gezeigt.

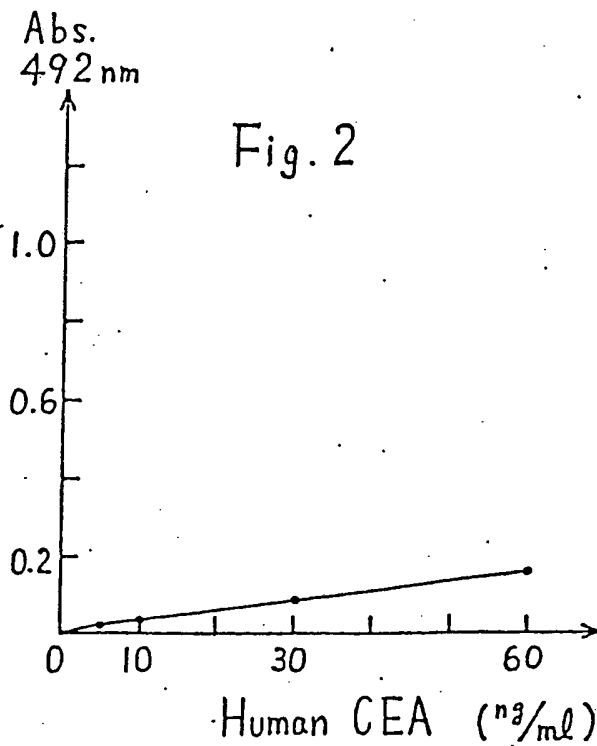
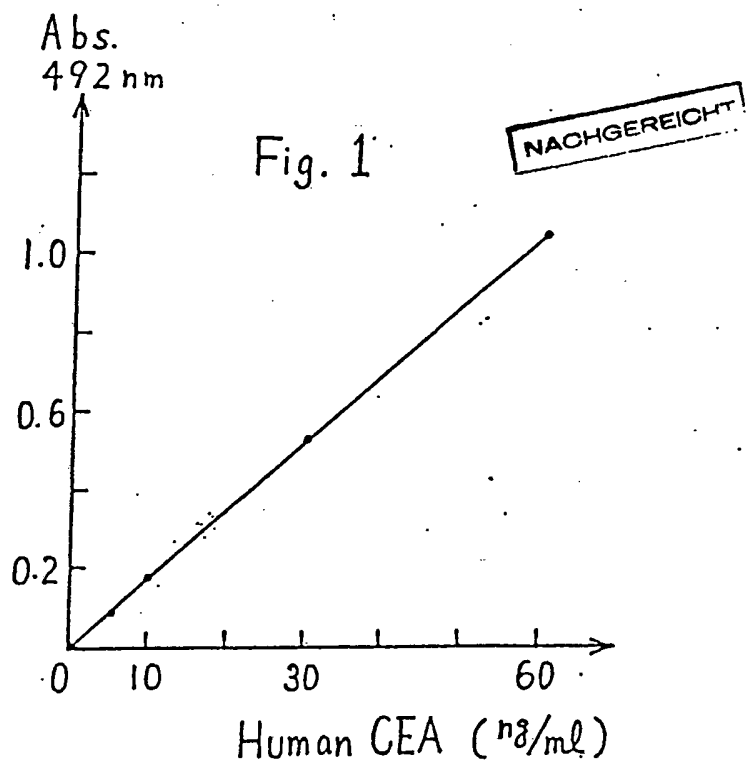
Tabelle 2

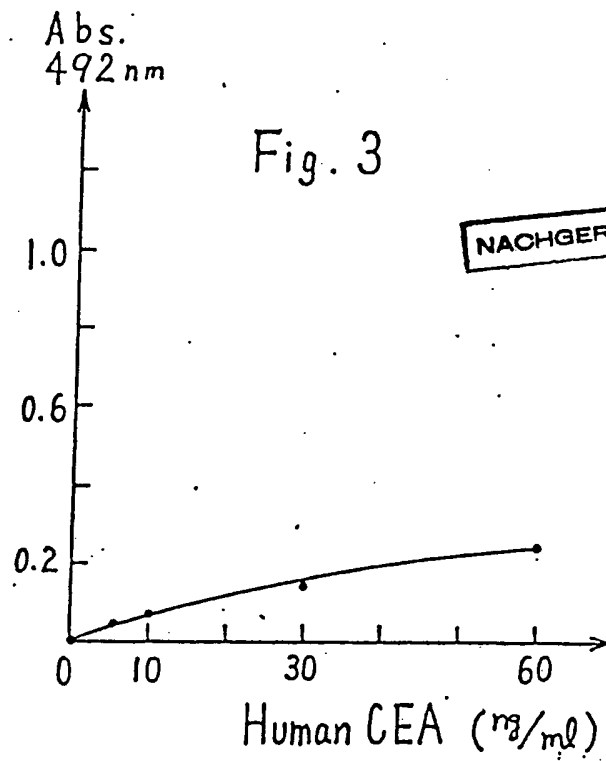
	Empfind- lichkeit IU/ml	Test- bereich IU/ml	Präzision IU/ml (Variationsko- effizient,%)	IU/ml (Variationsko- effizient,%)
15				
20				
Beispiel 2	2,0	0—50	2,8 ± 0,2 (7,1%)	26,0 ± 1,4 (5,4%)
25				
Vergleichsbeispiel 3	6,5	0—50	2,6 ± 0,7 (26,9%)	25,5 ± 4,3 (16,9%)
Vergleichsbeispiel 4	5,7	0—50	3,0 ± 0,6 (20,0%)	28,2 ± 4,7 (16,6%)

30 Das erfindungsgemäße EIA hat auch im Falle eines geringen Titors des zweiten Antikörpers eine ausreichend hohe Empfindlichkeit, wohingegen die EIA-Sandwich- und die EIA-Methode mit drei aufeinander folgenden Immunreaktionen eine schlechte Empfindlichkeit, insbesondere, wenn der Titer des zweiten Antikörpers gering ist, aufweisen. Die Erfindung stellt auch für den Fall, daß der zweite Antikörper ungereinigt ist, wie beispielsweise bei Antiseren, Kultur- oder Ascitesflüssigkeiten, eine hohe Empfindlichkeit bereit. Zusätzlich kann eine hohe

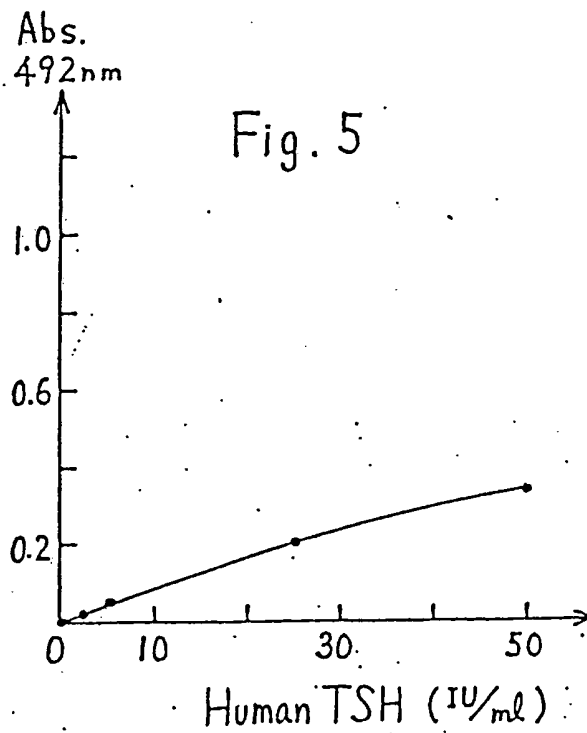
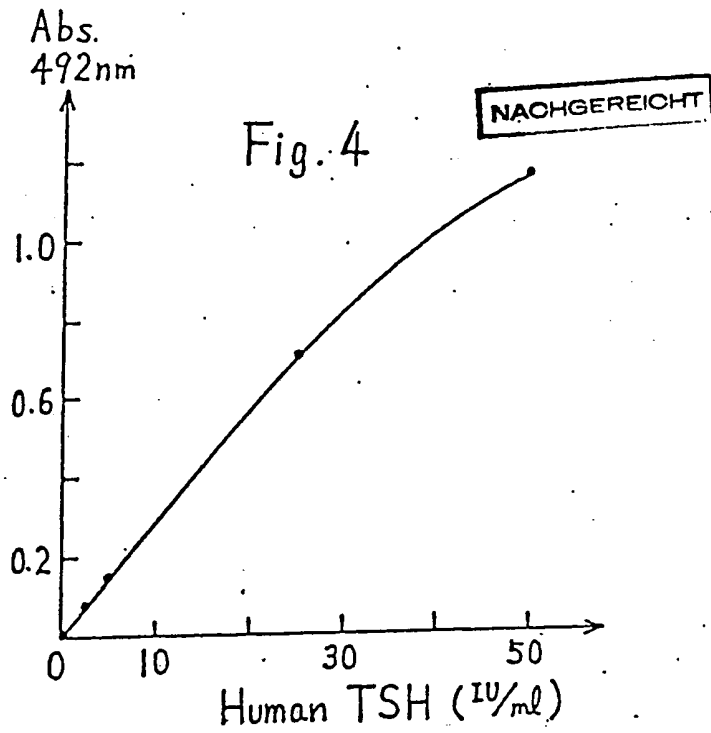
35 Empfindlichkeit erfindungsgemäß erhalten werden, wenn als zweiter Antikörper ein monoclonaler Antikörper verwendet wird, wobei monoclonale Antikörper im allgemeinen eine hohe Spezifität, aber eine geringe Affinität und deshalb geringe Empfindlichkeit aufweisen. Demzufolge kann eine hochspezifische Bestimmung mit einer hohen Empfindlichkeit erfindungsgemäß durch Verwendung eines monoclonalen Antikörpers als zweiten Antikörper erzielt werden. Damit ist die vorliegende Erfindung als diagnostisches Mittel für CEA, TSH, HCG-beta

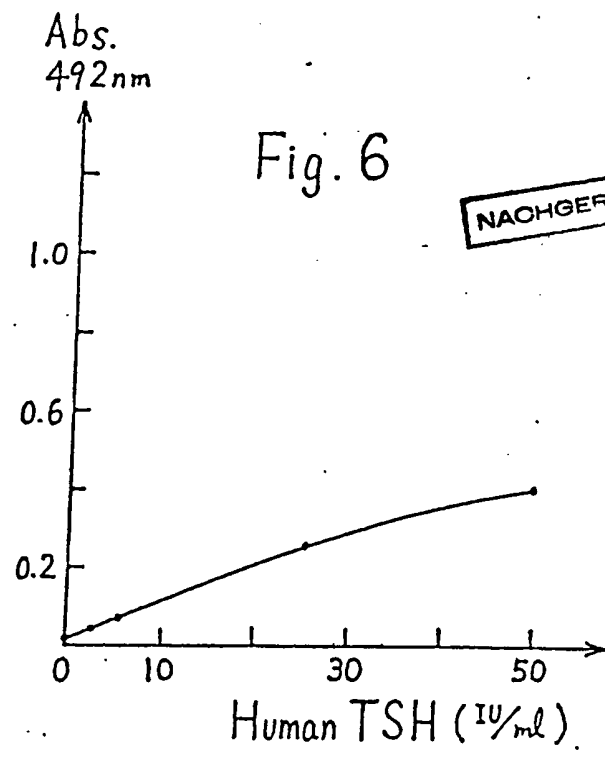
40 und HBs Antigene, für deren Bestimmung eine hohe Empfindlichkeit verlangt wird, besonders geeignet.





ORIGINAL INSPECTED





NAOCHGEREICH